

磷酸果糖激酶（PFK）活性检测试剂盒说明书

微量法

注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。

货号：BC0535

规格：100T/96S

产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体 110 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂一	液体 20 mL×1 瓶	2-8℃保存
试剂二 A	粉剂×1 瓶	-20℃保存
试剂二 B	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂二 C	粉剂×2 支	-20℃保存
试剂二 D	粉剂×1 支	-20℃保存
试剂三	液体 25μL×1 支	2-8℃保存
试剂四	液体 10μL×1 支	2-8℃保存

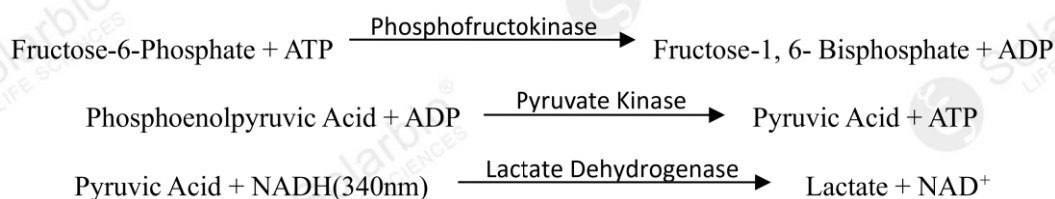
溶液的配制：

- 1、试剂二 A：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 2、试剂二 B：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 3、试剂二 C：临用前取一支加入 0.5mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存 2 周，避免反复冻融；
- 4、试剂二 D：临用前加入 1mL 蒸馏水，用不完的试剂-20℃分装保存 4 周，避免反复冻融；
- 5、试剂三：临用前根据用量按照试剂三:蒸馏水为 1μL:50μL（约 5T）的体积比例充分混匀，现用现配；
- 6、试剂四：临用前根据用量按照试剂四:蒸馏水为 1μL:125μL（约 12T）的体积比例充分混匀，现用现配；
- 7、工作液的配制：根据样本量按试剂一：试剂二 A：试剂二 B：试剂二 C：试剂二 D=8mL：0.5mL：0.5mL：0.5mL：0.5mL（约 55T）的比例配制工作液，现用现配。

产品说明：

磷酸果糖激酶（Phosphofructokinase, PFK, EC 2.7.1.11）广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，负责将果糖-6-磷酸和 ATP 转化为果糖二磷酸和 ADP，是糖酵解过程的关键调节酶之一。

PFK 催化果糖-6-磷酸和 ATP 生成果糖-二磷酸和 ADP，丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化 NADH 氧化生成 NAD⁺，在 340nm 下测定 NADH 下降速率，即可反映 PFK 活性。



注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。





需自备的仪器和用品：

紫外分光光度计/酶标仪、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔 UV 板、研钵/匀浆器/细胞超声破碎仪、冰和蒸馏水。

操作步骤：

一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ 10^4 个）：提取液体积（mL）为 500-1000：1 的比例（建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 组织：按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1:5-10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），进行冰浴匀浆；8000g 4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。
3. 血清（浆）等其他液体：直接检测。若有沉淀请离心后取上清待测。

二、测定步骤

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 340nm，分光光度计蒸馏水调零。
2. 工作液临用前于 37℃预热 10min。
3. 操作表：

试剂名称（ μL ）	测定管
样本	10
试剂三	10
试剂四	10
工作液	170

将上述试剂按顺序加入微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中，立即充分混匀后于 340nm 处测定 20s 时的吸光值 A_1 ，迅速置于 37℃准确反应 10min（酶标仪有控温功能可将温度调至 37℃），拿出迅速擦干测定 10min20s 时的吸光值 A_2 。计算 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

三、PFK 活性的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下：

1、血清（浆）PFK 活性的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD^+ 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PFK 活性 (U/mL)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 321 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 PFK 活性的计算：

（1）按样本蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD^+ 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PFK 活性 (U/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 321 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

（2）按样本质量计算

单位的定义：每 g 组织在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD^+ 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PFK 活性 (U/g 质量)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div W$$



(3) 按细菌或细胞数量计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞在反应体系中每分钟催化 1nmol NADH 转化为 1nmol NAD⁺ 定义为一个酶活性单位。

$$\text{PFK 活性 (U/10}^4\text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (N \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 321 \times \Delta A \div N$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴L；ε：NADH 摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：微量石英比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01mL；V 样总：加入提取液体积，1mL；T：反应时间，10min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；N：细菌或细胞总数，以万计；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

b. 用 96 孔 UV 板测定的计算公式如下：

将上述公式中的 d-1cm 改为 d-0.6cm（96 孔 UV 板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. 测定过程中试剂三、试剂四和样本在冰上放置，以免变性和失活。
2. 微量石英比色皿中反应液的温度必须保持 37℃，取小烧杯一只装入一定量的 37℃蒸馏水，将此烧杯放入 37℃水浴锅中。在反应过程中把微量石英比色皿连同反应液放在此烧杯中。
3. 最好两个人同时做此实验，一个人比色，一个人计时，以保证实验结果的准确性。
4. 不同匀浆组织中 PFK 活性不一样，若 ΔA>0.5，则说明活性太高，必须用提取液稀释成适当浓度匀浆上清液，或缩短反应时间至 2min 或 5min，使 ΔA<0.5，以提高检测的灵敏度。注意同步修改计算公式。

实验实例：

- 1、取 0.1g 黑麦草加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA=A₁-A₂=1.6086-1.2986=0.31，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PFK 活性 (U/g 质量)} = 535 \times \Delta A \div W = 535 \times 0.31 \div 0.1 = 1658.5 \text{ U/g 质量。}$$

- 2、取 0.1g 桃叶加入 1mL 提取液进行匀浆研磨，取上清之后按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 ΔA=A₁-A₂=1.7025-1.6159=0.0866，按样本质量计算酶活得：

$$\text{PFK 活性 (U/g 质量)} = 535 \times \Delta A \div W = 535 \times 0.057 \div 0.1 = 463.31 \text{ U/g 质量。}$$

相关发表文献：

[1] Yu Y, Hu L, Tian D, Yu Y, Lu L, Zhang J, Huang X, Yan M, Chen L, Wu Z, Shi W, Liu G. Toxicities of polystyrene microplastics (MPs) and hexabromocyclododecane (HBCD), alone or in combination, to the hepatopancreas of the whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Environ Pollut*. 2023 Jul 15;329:121646. doi: 10.1016/j.envpol.2023.121646. Epub 2023 Apr 25. PMID: 37105466.

[2] Yu Y, Tian D, Yu Y, Lu L, Shi W, Liu G. Microplastics aggravate the bioaccumulation and corresponding food safety risk of antibiotics in edible bivalves by constraining detoxification-related processes. *Sci Total Environ*. 2024 Jan 15;908:168436. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.168436. Epub 2023 Nov 8. PMID: 37949129.

[3] Chen S, Wu Y, Gao Y, Wu C, Wang Y, Hou C, Ren M, Zhang S, Zhu Q, Zhang J, Yao Y, Huang M, Qi YB, Liu XS, Horng T, Wang H, Ye D, Zhu Z, Zhao S, Fan G. Allosterically inhibited PFKL via prostaglandin E2 withholds glucose metabolism and ovarian cancer invasiveness. *Cell Rep*. 2023 Oct 31;42(10):113246. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113246. Epub 2023 Oct 12. PMID: 37831605.





[4] Du X, Zhou W, Zhang W, Sun S, Han Y, Tang Y, Shi W, Liu G. Toxicities of three metal oxide nanoparticles to a marine microalga: Impacts on the motility and potential affecting mechanisms. Environ Pollut. 2021 Dec 1;290:118027. doi: 10.1016/j.envpol.2021.118027. Epub 2021 Aug 21. PMID: 34428706.

[5] Yu Y, Tian D, Han Y, Huang L, Tang Y, Zhang W, Zhou W, Shi W, Yu Y, Liu G. Impacts of microplastics and carbamazepine on the shell formation of thick-shell mussels and the underlying mechanisms of action. Sci Total Environ. 2022 Sep 10;838(Pt 3):156442. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156442. Epub 2022 Jun 2. PMID: 35660597.

参考文献:

[1] Papagianni M, Avramidis N. Lactococcus lactis as a cell factory: a twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation[J]. Enzyme and microbial technology, 2011, 49(2): 197-202.

相关系列产品:

BC2200/BC2205 丙酮酸 (PA) 含量检测试剂盒

BC2230/BC2235 乳酸 (LA) 含量检测试剂盒

BC2190/BC2195 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (PEPC) 活性检测试剂盒

BC2250/BC2255 3-磷酸甘油酸激酶 (PGK) 活性检测试剂盒

